Śledzenie fenotypu starzenia się na poziomie komórkowym

Starzenie to proces, od którego nie ma ucieczki ani wyjątków. Dotyczy wszystkich organizmów, niezależnie od tego czy to są organizmy jednokomórkowe, czy złożone z wielu zróżnicowanych komórek. Co ciekawe, na poziomie komórkowym starzenie przebiega u nich wszystkich bardzo podobnie. Starzejące się komórki gromadzą uszkodzenia DNA, białek czy lipidów, bo już nie potrafią ich naprawić, ani usunąć. Mniej wydajnie produkują energię. Wolniej lub niewłaściwie odpowiadają na sygnały płynące z otoczenia. Przestają się dzielić, a jedyne do czego są zdolne to trwanie, choć trzeba przyznać, że poszczególne komórki różnie sobie z tym radzą – jedne trwają dłużej inne krócej. Dotychczas zgromadzone dane wskazują na wysokie międzygatunkowe podobieństwo mechanizmów, które warunkują starzenie. Chociaż, w tym przypadku należy raczej mówić o mechanizmach, które zaczynają zawodzić, czego efektem jest starzenie. Skoro zaś mechanizmy te są zbliżone, dlaczego nie badać ich w układzie wygodnym dla badacza. Dlatego, też w badaniach starzenia często stosowanym modelem są komórki drożdży piekarskich. W badaniach z użyciem drożdży stosuje się dwa podejścia eksperymentalne: analiza replikacyjnej długości życia, czyli badanie ile podziałów dana komórka jest w stanie przeprowadzić, oraz analiza chronologicznej długości życia, czyli sprawdzenie jak długo dana komórka przetrwa w niekorzystnych warunkach (ograniczonej dostępności pokarmu) zachowując zdolność wzrostu i podziałów, gdy tylko warunki pokarmowe się poprawią.

Ostatnio, badając chronologiczną długość życia, odkryliśmy coś całkiem nieoczekiwanego. Mierząc zawartość DNA starzejących się komórek, stwierdziliśmy, że wyjściowo diploidalne komórki, podczas starzenia stopniowo tracą swoje DNA, aż do poziomu typowego dla komórek haploidalnych. Ilością DNA graniczną dla możliwości podjęcia wzrostu okazała się zawartość DNA - *1c* - czyli dokładnie jedna kopia DNA rodzicielskiego, co było zaskakujące o tyle, że komórki diploidalne zwykle posiadają co najmniej dwie takie kopie, po jednej od każdego z rodziców, czyli *2c*. Natomiast przed kolejnym podziałem, po kolejnej rundzie syntezy DNA mają cztery takie kopie, *4c*. Stwierdziliśmy również, że starzejące się komórki o zawartości DNA *1c*, jeśli zachowały żywotność, po zapewnieniu im dostępu do obfitości pożywienia odtwarzają populację komórek diploidalnych zawierających DNA w ilości od *2c* do *4c*. **Celem proponowanego projektu jest wyjaśnienie, jak dochodzi do opisanych zmian zawartości DNA, czyli jego redukcji podczas starzenia i odtworzenia właściwej ilości po poprawie warunków wzrostu**.

Chcemy wyodrębniać, w kolejnych punktach czasowych, ze starzejącej się chronologicznie populacji drożdży wciąż żywe komórki, poprzez ich wysokowydajne sortowanie (potrzebne jest użycie FACS, od ang. *fluorescence-activated cell sorter*). A następnie charakteryzować ich cechy fenotypowe używając różnych testów biochemicznych, cytometrycznych, mikroskopii fluorescencyjnej, sekwencjonowania całogenomowego, itd. Uzyskane przez nas wstępne dane sugerują, że w proces utraty DNA zaangażowane są różne ścieżki autofagii, procesu pomagającego usuwać z komórek uszkodzone cząsteczki, a nawet niefunkcjonalne organella. Sprawdzimy wpływ na przeżywalność komórek podczas starzenia ścieżek nukleofagii, mikroautofagii jądra (PMN) oraz mitofagii. Podejrzewamy, że aktywacja nukleofagii może odpowiadać za szybki spadek żywotności komórek w początkowej fazie starzenia, a aktywacja PMN umożliwia usuwanie z jądra komórkowego produktów naprawy uszkodzonego DNA, wraz z enzymami uczestniczącymi w tym procesie, co umożliwia komórkom przetrwanie i pomaga uniknąć rearanżacji genomowych. Sądzimy, że proces odzyskiwania utraconych kopii genomowego DNA podczas wzrostu komórek na podłożu bogatym w związki pokarmowe skutkiem polega na auto-duplikacji (endoreduplikacji). Eksperymenty planowane w projekcie pozwolą na weryfikację tej hipotezy.

Badania, które proponujemy pozwolą poszerzyć naszą wiedzę na temat starzenia komórek, odkryć procesy i reguły dotychczas nieznane. Ponieważ zaś, jak już wspomnieliśmy na wstępie, mechanizmy starzenia są uniwersalne w świecie organizmów żywych, odkryte reguły mogą mieć zastosowanie również w komórkach ludzkich. Zwłaszcza, że starzejące się komórki człowieka również wykazują cechy niedożywienia.